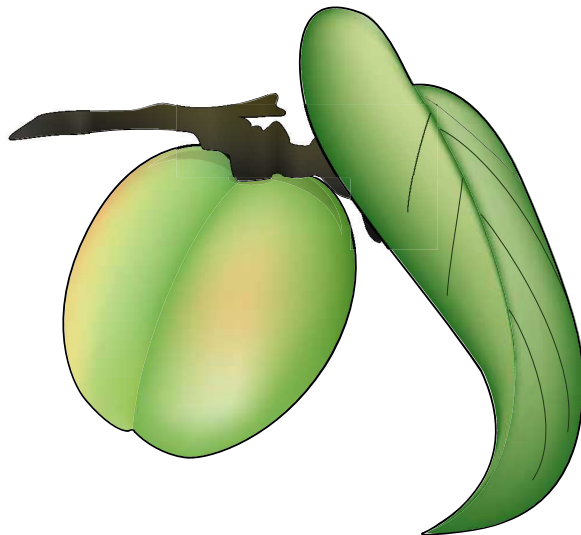
プラムポックスウイルス検出キット

plum pox virus Detection Kit

取扱説明書

version 5.0.0

製品コード
NE0071
NE0073

プラムポックスウイルス検出キット
取扱説明書 version 5. 0. 0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**プラムポックスウイルス検出キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP法を用いてプラムポックスウイルスを検出するための試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットは、日本国内で採取されたプラムポックスウイルス罹病ウメ樹木の実検体を用いて性能を確認しております。ウメ以外の樹木には使用できません。

3. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】（2ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

4. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび**PPV陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

7. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン；http://nippongene-analysis.com/

8. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

9. LAMP法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP法を用いたプラムポックスウイルス検出用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

10. **プラムポックスウイルス検出キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
    株式会社富士通システムズ・イースト
    e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）；http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

1. **キット説明**…………………………………………………………………………………… 1

プラムポックスウイルス検出キットの概要
プラムポックスウイルスとその診断
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して

2. **キット内容**…………………………………………………………………………………… 2

キット内容と保存温度

3. **必要な器具、機器** ……………………………………………………………………… 3

4. **キット使用方法** ………………………………………………………………………… 5

簡易プロトコル……………………………………………………………………………5
検査を行う前の準備および注意事項……………………………………………………7
サンプルの準備
器具、機器の準備
検査環境
詳細な使用方法 ……………………………………………………………………………9
検査反応
判定

5. **トラブルシューティング**…………………………………………………………………… 14

6. **文献・資料**………………………………………………………………………………… 15

7. **付録**………………………………………………………………………………………… 16

品質管理
PPV陽性コントロールのコピー数
メモ

本キットに含まれているLAMPプライマーセットおよびこのLAMPプライマーセットを用いたLAMP法によるプラムポックスウイルスの検出技術は、東京大学 植物病院®により開発されました。
本キットの商品名には、plum pox virus の英名の発音に従って「プラムポックスウイルス」を使用しております。本ウイルスの和名およびその感染によるウメの病名（和名）は、日本植物病理学会により 2010 年にそれぞれ「ウメ輪紋ウイルス」および「ウメ輪紋病」に決定されています。

1. キット説明

【プラムポックスウイルス検出キットの概要】

本キットはLAMP法を利用してプラムポックスウイルス（plum pox virus; PPV）を検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便なDNA増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、逆転写酵素を用いてcDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うRT-LAMP法によりプラムポックスウイルスゲノムRNAの一部を増幅し、増幅の有無からプラムポックスウイルスの存在を判定します。

検出に必要な操作は、プラムポックスウイルスの感染が疑われるウメの葉を突いた爪楊枝を検査溶液（**PPV検査液**、**PPV酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に浸し、63°Cに60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。検体中にプラムポックスウイルスが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってプラムポックスウイルスゲノムRNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体中にプラムポックスウイルスが存在しない場合には、DNA増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、cDNA合成からDNA増幅反応、検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でプラムポックスウイルスゲノムRNAを検出することが可能です。

【プラムポックスウイルスとその診断】

プラムポックスウイルス（plum pox virus）は、モモ、ネクタリン、プルーン、スモモ、アンズ、サクランボなどのサクラ属の果樹に甚大な被害を与える植物ウイルスであり、近年、世界的に発生が拡大しています。サクラ属の果樹では、感染により果実の早期落果や奇形、花弁への斑入り症状が起こる事例が知られています。

我が国では、2009 年 3 月に東京大学 植物病院®において、これまで世界でも自然感染の例が無かったウメからプラムポックスウイルスが検出されました。プラムポックスウイルスは接木の他、アブラムシにより媒介されることから、病気が発生した園地では感染植物の除去、ウイルスを媒介する可能性のあるアブラムシの防除を徹底する等、防除策を講じる必要があります。罹病樹から健全樹への感染拡大を防止するためには罹病樹の早期発見、除去が不可欠となります。

本キットの商品名には、plum pox virus の英名の発音に従って「プラムポックスウイルス」を使用しております。本ウイルスの和名およびその感染によるウメの病名（和名）は、日本植物病理学会により 2010 年にそれぞれ「ウメ輪紋ウイルス」および「ウメ輪紋病」に決定されています。

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。また、増幅する対象の遺伝子がRNAである場合には、逆転写酵素を用いることにより、cDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うことが可能です（RT-LAMP法）。

LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社

Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

プラムポックスウイルス検出キット

48 テスト用（製品コード: NE0071）

192 テスト用（製品コード: NE0073）

試薬名（チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量		保存温度
		48 テスト用	192 テスト用	
取扱説明書	−	1 部	1 部	室温
検査用チューブ	−	48 本	48 本 x 4 袋	室温
PPV検査液	赤色	1,150 μl	1,150 μl x 4 本	−20°C (遮光)
PPV酵素液	緑色	50 μl	50 μl x 4 本	−20°C (遮光)
蛍光発色液	紫色	50 μl	50 μl x 4 本	−20°C (遮光)
PPV陽性コントロール	灰色	25 μl	25 μl x 4 本	−20°C (遮光)
ミネラルオイル	青色	1,000 μl	1,000 μl x 4 本	−20°C (遮光)

取り扱い上の注意

◆ 本キットでは、49 テスト分あるいは 192 テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、48 テスト分あるいは 192 テスト分の検査反応を行うことが可能です。48 テスト分あるいは 192 テスト分以下の検査反応を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。

◆ **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。

◆ **取扱説明書**および**検査用チューブ**以外の試薬は−20°C で遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。

◆ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20°Cで保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。

◆ **PPV酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。

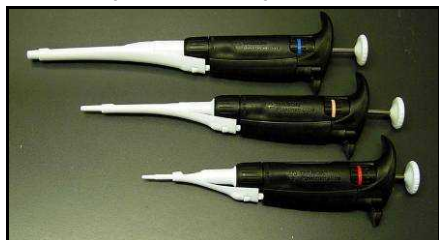
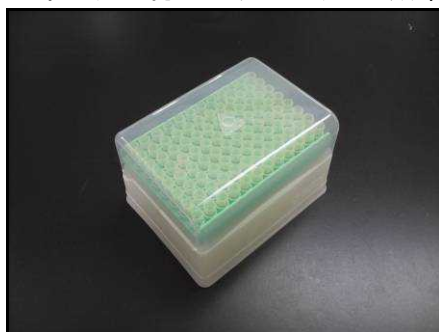
◆ **PPV陽性コントロール**は、プラムポックスウイルスゲノムRNAに特徴的な配列を含むRNA溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。

◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

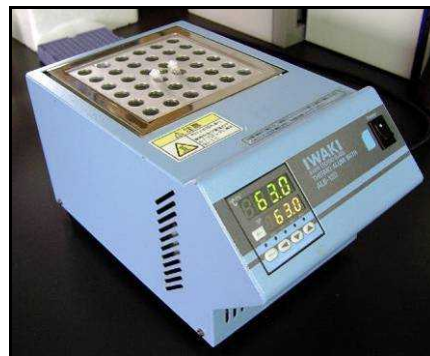
◆ ミネラルオイルに関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物(第五百五十一号)」に該当します。必ず MSDS を参照の上、使用してください。

3. 必要な器具、機器

【必ずご準備頂く器具、機器】

- マイクロピペット
  (0.5−10 μl、10−100 μl、200−1,000 μl)

- フィルター付マイクロチップ（滅菌済）*

- マイクロチューブ
  (1.5 ml あるいは 2.0 ml)

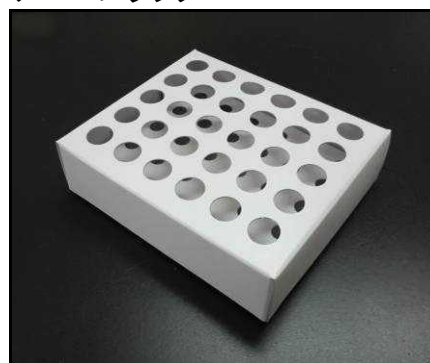
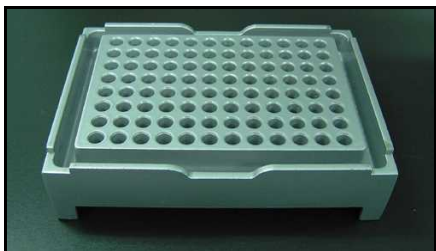
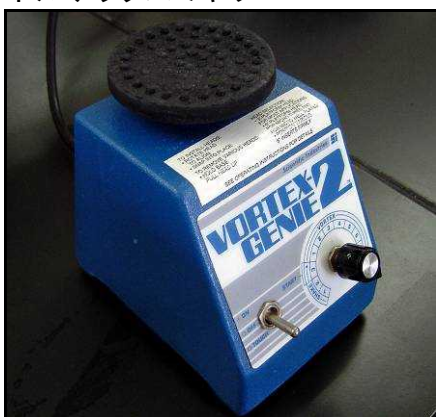
- 使い捨て手袋

- インキュベーター（恒温器）
  ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、63°C を保持する機器が必要です。

- 木製の爪楊枝

- 氷（クラッシュアイス）

【その他の器具、機器】

　下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック*

● アルミラックあるいはプレートラック

● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● フロートプレート*
ウォーターバスで保温する際に使用します。

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。
240−260 nm あるいは 350−370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

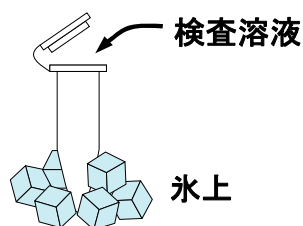
* フィルター付マイクロチップ、チューブラック、フロートプレートがセットになった**診断キットスターターセット**（製品コード： NE0051）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

4. キット使用方法

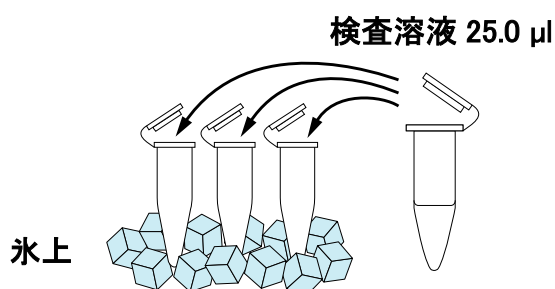
【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

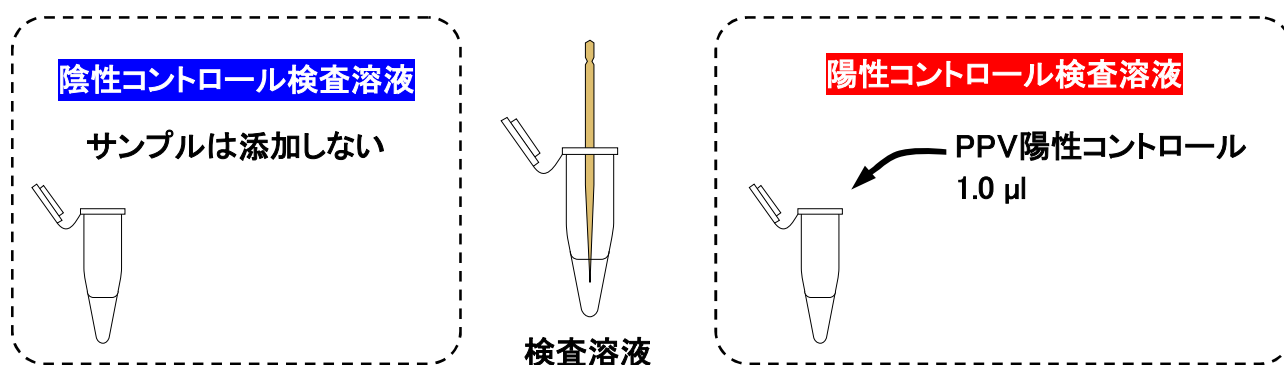
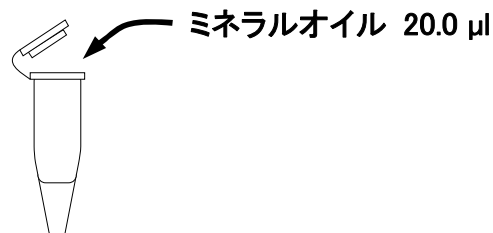
1. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
PPV検査液	23.0 µl	207.0 µl	575.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
PPV酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
合計	25.0 µl	225.0 µl	625.0 µl

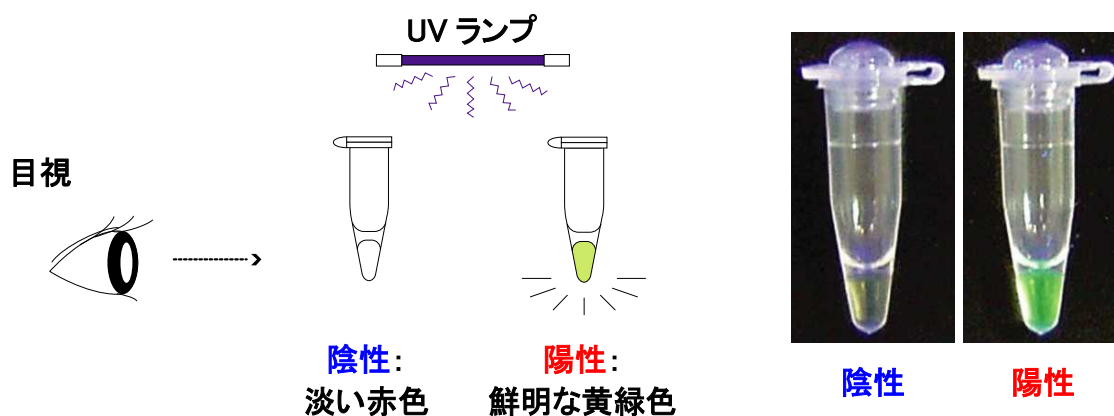
＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

2. 検査溶液を 1 テストあたり 25.0 µl ずつ分注する

3. サンプルを爪楊枝で突く

4. 前工程の爪楊枝を検査溶液に浸す

5. ミネラルオイルを入れる

6. 63˚C、60 分間

7. 80˚C、2 分間

8. 判定

【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■　**コントロール**

本キットには、検査の成否を確認するための**PPV陽性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、**PPV陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および**PPV陽性コントロール**を添加しない「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■　**爪楊枝を用いたウメサンプル準備**

通常のプロトコルではウメ葉あるいは葉を枝ごと採取し、作業区域の固い作業台にウメの葉を置いて爪楊枝で病徴部（退緑斑点、輪紋）を突いて検査を行います（10 ページ参照）が、園地などで葉を突き、その爪楊枝のみを回収して後から検査に用いることも可能です。この場合、爪楊枝は清潔なビニール袋に入れて保存してください。回収した爪楊枝は、1 時間程度であれば常温（20 から 30°C 程度）での保存も可能です。凍結したウメ葉サンプル、ウメ果実、ウメ葉柄、ウメ枝からのサンプル採取に関しては、17 ページの**【他のサンプル採取方法】**を参照してください。

器具、機器の準備

■　**インキュベーター（恒温器）**

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■　**器具**

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

　LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に**PPV陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび**PPV陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■　作業区域

　核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では**PPV陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。
　検査溶液へのサンプルおよび**PPV陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■　核酸除去操作

　器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。
　高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

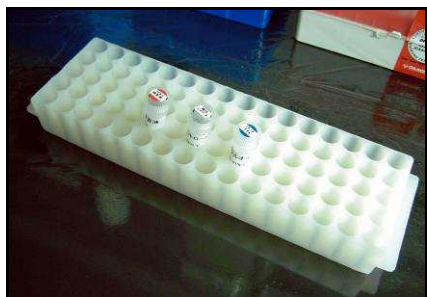
＜方法＞

i)　使い捨て手袋を装着します。
ii)　有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii)　次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv)　非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v)　作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

ここでは、葉からの検査プロトコルを記載しています。凍結したウメ葉サンプル、ウメ果実、ウメ葉柄、ウメ枝からのサンプル採取に関しては、17 ページの**【他のサンプル採取方法】**を参照してください。

検査反応

試薬の融解

PPV検査液、**PPV陽性コントロール**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**PPV酵素液**および**蛍光発色液**は−20°Cでは凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン

チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製

マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

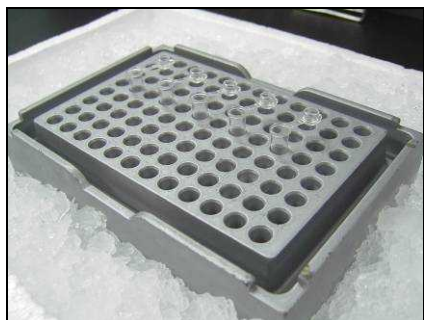
試薬	1テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
PPV検査液	23.0 μl	207.0 μl	575.0 μl
蛍光発色液	1.0 μl	9.0 μl	25.0 μl
PPV酵素液	1.0 μl	9.0 μl	25.0 μl
検査溶液合計	25.0 μl	225.0 μl	625.0 μl

＊　分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

重要

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回ごとに使い捨てとして使用してください。

PPV酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンダウンを行ってください。

検査溶液の分注

核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を 25.0 μl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

サンプルの採取

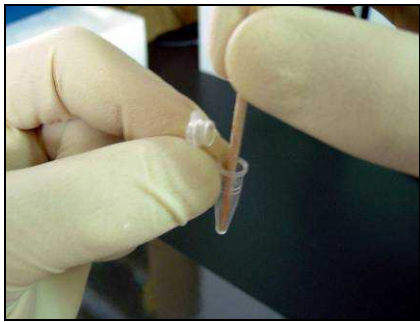
固い作業台にウメの葉を置き、爪楊枝で病徴部（退緑斑点、輪紋）を真上から垂直に1回突きます。

病徴が弱い場合には、同一の爪楊枝にて病徴部を2から5箇所突いてください。

サンプルの採取に関しては、7ページもご参照ください。

重要

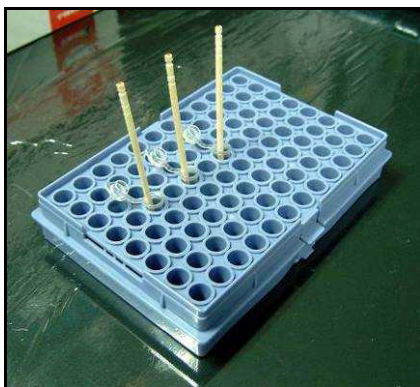
プラムポックスウイルスは感染ウメ樹木においても、病徴を強く呈示している部位に局在する傾向がありますので、葉では黄色の部位（退緑斑点、輪紋）、葉柄、果実では淡い輪紋症状を呈する退色部位など、プラムポックスウイルスの存在が特に疑われる部位を爪楊枝で突いてください。葉柄、果実からのサンプル採取に関しては、17ページの【他のサンプル採取方法】をご参照ください。

サンプルの添加

前工程の爪楊枝を検査溶液に浸して**検査用チューブ**の底に軽くこすり付けます。その後、爪楊枝は速やかに取り出し、ビニール袋にまとめて廃棄します。サンプル添加後、各チューブにミネラルオイルを20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。

コントロールを作製する場合は、

i）サンプル添加の前に陰性コントロール検査溶液のチューブに20.0 µlの**ミネラルオイル**を分注してキャップを閉じます。

ii）爪楊枝でサンプルを添加し、各チューブに**ミネラルオイル**を20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。

iii）最後に、陽性コントロール検査溶液のチューブに**PPV陽性コントロール**を1.0 µl添加し、**ミネラルオイル**を20.0 µl分注してキャップを閉じます。

重要

爪楊枝を浸した状態で放置すると検査溶液を吸収するため、検査溶液の液量が減少し、判定が困難になります。サンプルを添加した後は爪楊枝を検査溶液中に放置しないよう、ご注意ください。

ミネラルオイルを添加しなかった場合、蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が著しく低下します。検査の際はキット添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。

検査反応

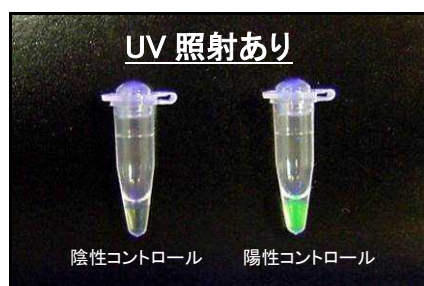
全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーターなどを用いて 63°C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、**検査用チューブ**が反応中に傾かないようにしてください。

判定

検査の成否の判定

60分間保温した後、80°C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は 60 分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にプラムポックスウイルスが存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「**プラムポックスウイルス陽性**」と判定します。
仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、対象とするウメ樹木から別の葉を採取して再度検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「**プラムポックスウイルス陰性**」と判定します。
ただし、プラムポックスウイルスはウメ樹木中に不均一に分布している場合があります。病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は再度複数箇所の葉を採取して検査を行ってください。

重要
本キットの判定結果に関わらず、プラムポックスウイルスの感染が疑われる場合には、東京大学 植物病院®までご相談ください。

東京大学 植物病院®; http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cps/hospital/
住所:　東京都文京区弥生1-1-1
TEL:　03-5841-0567
E-mail:　byoin@todaiagri.jp

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. PPV陽性コントロールの添加量が過剰である。** **PPV陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**PPV陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240−260 nm あるいは 350−370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。

6. 文献・資料

1. Maejima K, Hoshi H, Hashimoto M, Himeno M, Kawanishi T, Komatsu K, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S. (2010) First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *J Gen Plant Pathol.* **76** (3): 229

2. Maejima K, Himeno M, Komatsu K, Takinami Y, Hashimoto M, Takahashi S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. (2011) Molecular epidemiology of plum pox virus in Japan. *Phytopathology*. **101** (5): 567

3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

4. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の**PPV陽性コントロール** 1.0 μl を鋳型として 25.0 μl（1 テスト分）の容量でDNA増幅反応を行い、63°C、60 分間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

【PPV陽性コントロールのコピー数】

PPV陽性コントロールには、1.0 μl あたり 1x 10^9 コピーの標的配列が含まれています。

【他のサンプル作製方法】

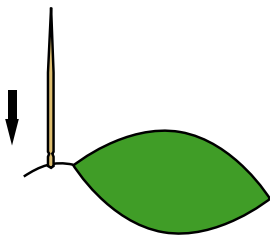
凍結した葉からの検出

凍結保存しておいた葉を室温に戻す

サンプルを爪楊枝で突く

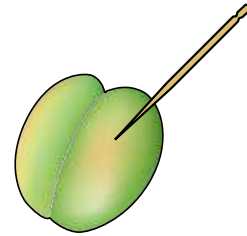
爪楊枝を検査溶液に浸す

葉柄からの検出

爪楊枝の頭で葉柄部分を潰す

潰した葉柄の中心付近を爪楊枝の先端で突く

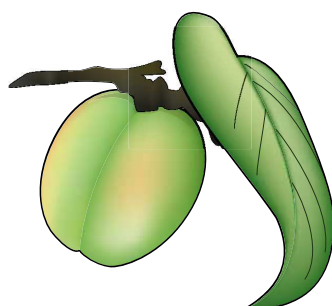
爪楊枝を検査溶液に浸す

果実からの検出

輪紋あるいは輪紋の中央、退色部を核（種子の外側の固い部分）に当たるまで爪楊枝で 1 回突く

爪楊枝を検査溶液に浸す

枝からの検出

サンドペーパー等を用いた磨砕法により、枝から直接サンプルを採取して検査を行うことが可能です。

詳細は、株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2012 年 11 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com/

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-5977-5573
FAX	03-5977-5574
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp